

PCT

WELTORGANISATION FÜR GEISTIGES EIGENTUM
Internationales Büro



INTERNATIONALE ANMELDUNG VERÖFFENTLICHT NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE
INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT)

(51) Internationale Patentklassifikation 6 : C12N 15/12, C07K 14/47, A61K 38/17, C07K 16/18		A2	(11) Internationale Veröffentlichungsnummer: WO 99/64584 (43) Internationales Veröffentlichungsdatum: 16. Dezember 1999 (16.12.99)
(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/DE99/01712 (22) Internationales Anmeldedatum: 8. Juni 1999 (08.06.99) (30) Prioritätsdaten: 198 25 621.3 8. Juni 1998 (08.06.98) DE (71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten ausser US): DEUTSCHES KREBSFORSCHUNGSZENTRUM STIFTUNG DES ÖFFENTLICHEN RECHTS [DE/DE]; Im Neuenheimer Feld 280, D-69120 Heidelberg (DE). (72) Erfinder; und (75) Erfinder/Anmelder (nur für US): PETER, Marcus [DE/DE]; Am Schlierbachhang 68, D-69118 Heidelberg (DE). KRAMMER, Peter [DE/DE]; Werderstrasse 11, D-69120 Heidelberg (DE). (74) Anwalt: SCHÜSSLER, Andrea; Huber & Schüssler, Trud- eringer Strasse 246, D-81825 München (DE).		(81) Bestimmungsstaaten: AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CU, CZ, DK, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZW, ARIPO Patent (GH, GM, KE, LS, MW, SD, SL, SZ, UG, ZW), eurasisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OAPI Patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG). Veröffentlicht <i>Ohne internationalen Recherchenbericht und erneut zu veröffentlichen nach Erhalt des Berichts.</i>	
(54) Title: PROTEIN FOR REGULATING APOPTOSIS (54) Bezeichnung: PROTEIN ZUR REGULATION VON APOPTOSE (57) Abstract <p>The invention relates to a protein which is suited for regulating apoptosis, to a DNA which codes for such a protein, and to a method for producing such a protein. The invention also relates to antibodies directed against the protein, and to the use of the DNA and of the protein for regulating apoptosis or the diagnostic detection thereof.</p> (57) Zusammenfassung <p>Die vorliegende Erfindung betrifft ein Protein, das sich zur Regulation von Apoptose eignet, eine für ein solches Protein kodierende DNA und ein Verfahren zur Herstellung eines solchen Proteins. Ferner betrifft die Erfindung gegen das Protein gerichtete Antikörper sowie die Verwendung der DNA und des Proteins zur Regulation von Apoptose bzw. deren diagnostischer Erfassung.</p>			

LEDIGLICH ZUR INFORMATION

Codes zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäss dem PCT veröffentlichen.

AL	Albanien	ES	Spanien	LS	Lesotho	SI	Slowenien
AM	Armenien	FI	Finnland	LT	Litauen	SK	Slowakei
AT	Österreich	FR	Frankreich	LU	Luxemburg	SN	Senegal
AU	Australien	GA	Gabun	LV	Lettland	SZ	Swasiland
AZ	Aserbaidschan	GB	Vereinigtes Königreich	MC	Monaco	TD	Tschad
BA	Bosnien-Herzegowina	GE	Georgien	MD	Republik Moldau	TG	Togo
BB	Barbados	GH	Ghana	MG	Madagaskar	TJ	Tadschikistan
BE	Belgien	GN	Guinea	MK	Die ehemalige jugoslawische Republik Mazedonien	TM	Turkmenistan
BF	Burkina Faso	GR	Griechenland	ML	Mali	TR	Türkei
BG	Bulgarien	HU	Ungarn	MN	Mongolei	TT	Trinidad und Tobago
BJ	Benin	IE	Irland	MR	Mauretanien	UA	Ukraine
BR	Brasilien	IL	Israel	MW	Malawi	UG	Uganda
BY	Belarus	IS	Island	MX	Mexiko	US	Vereinigte Staaten von Amerika
CA	Kanada	IT	Italien	NE	Niger	UZ	Usbekistan
CF	Zentralafrikanische Republik	JP	Japan	NL	Niederlande	VN	Vietnam
CG	Kongo	KE	Kenia	NO	Norwegen	YU	Jugoslawien
CH	Schweiz	KG	Kirgisistan	NZ	Neuseeland	ZW	Zimbabwe
CI	Côte d'Ivoire	KP	Demokratische Volksrepublik Korea	PL	Polen		
CM	Kamerun	KR	Republik Korea	PT	Portugal		
CN	China	KZ	Kasachstan	RO	Rumänien		
CU	Kuba	LC	St. Lucia	RU	Russische Föderation		
CZ	Tschechische Republik	LI	Liechtenstein	SD	Sudan		
DE	Deutschland	LK	Sri Lanka	SE	Schweden		
DK	Dänemark	LR	Liberia	SG	Singapur		
EE	Estland						

Protein zur Regulation von Apoptose

Die vorliegende Erfindung betrifft ein Protein, das sich zur Regulation von Apoptose eignet, eine für ein solches Protein kodierende DNA und ein Verfahren zur Herstellung eines solchen Proteins. Ferner betrifft die Erfindung gegen das Protein gerichtete Antikörper sowie die Verwendung der DNA und des Proteins zur Regulation von Apoptose bzw. deren diagnostischer Erfassung.

Apoptose ist der programmierte Zelltod. Dieser unterliegt einer genauen Regulation, wobei Apoptose induziert bzw. inhibiert werden kann.

Die Induktion von Apoptose kann über eine Reihe von sog. Todesrezeptoren, d.h. Rezeptoren, die eine "Death Domain" (DD) enthalten, wie CD95, TNF-RI, DR3, DR4 oder DR5, erfolgen, die nach Bindung ihrer Liganden Apoptose-Signalwege induzieren. Beispielsweise interagiert nach Bindung des CD95-Liganden der CD95-Rezeptor mit dem Adapterprotein FADD/MORT1, wodurch das "Recruitment" und die Aktivierung der Protease FLICE/Caspase-8, am DISC "Death Inducing Signalling Complex" induziert werden. FADD und FLICE enthalten "Death Effector Domains" (DED).

Die Inhibition von Apoptose kann durch die Transkription von anti-apoptotischen Genen, d.h. durch deren Genprodukte, erfolgen. Beispielsweise inhibiert das Protein FLIP "FLICE-Inhibitory Protein" den CD95-Apoptose-Signalweg (vgl. Deutsches Patent 19713434 des Deutschen Krebsforschungszentrums).

Um jedoch gezielt in die Regulation von Apoptose eingreifen zu können ist es notwendig, weitere Moleküle bzw. Mechanismen zu kennen, die hieran beteiligt sind.

Der vorliegenden Erfindung liegt somit die Aufgabe zugrunde,

ein Mittel bereitzustellen, mit dem die Regulation von Apoptose untersucht und gegebenenfalls in sie eingegriffen werden kann.

Erfindungsgemäß wird dies durch die Gegenstände in den Patentansprüchen erreicht.

Gegenstand der vorliegenden Erfindung sind somit ein zur Regulation von Apoptose geeignetes Protein und eine für ein solches Protein kodierende DNA. Mit diesen Mitteln ist es möglich, die Regulation von Apoptose zu untersuchen bzw. in sie einzugreifen.

Die vorliegende Erfindung beruht auf den Erkenntnissen des Anmelders, daß in Tieren, besonders Säugetieren ganz besonders dem Menschen, ein Protein vorliegt, das sich zur Regulation, insbesondere Induktion, von Apoptose eignet. Ein solches Protein weist eine Größe von ca. 34kD auf. Es umfaßt die Aminosäuresequenz von Fig. 1A oder eine hiervon durch eine oder mehrere Aminosäuren unterschiedliche Aminosäuresequenz. Das Protein weist an seinem N-Terminus eine "Death Effector Domain" (DED) auf. Ferner umfaßt es an seinem C-Terminus Bereiche, die Homologien zu DNA-Bindungsproteinen, wie Histone, besitzen. Desweiteren bildet das Protein einen starken Komplex mit DNA aus. Auch wird es ubiquitär exprimiert. Darüberhinaus wandert es nach Induktion des CD95-Apoptose-Signalwegs mittels zweier Kernlokalisations-Signale "Nuclear Localization Signals" (NLS) in den Kern bzw. in die Nukleoli und inhibiert dort die Transkription ribosomaler DNA (vgl. Fig. 2-5), womit die Protein-Biosynthese und damit auch die Synthese von Genprodukten anti-apoptotischer Gene inhibiert wird.

Erfindungsgemäß werden die Erkenntnisse des Anmelders genutzt, ein zur Regulation von Apoptose geeignetes Protein (nachstehend mit DEDD bezeichnet) bereitzustellen, umfassend die Sequenz von Fig. 1A oder eine hiervon durch eine oder mehrere Aminosäuren unterschiedliche Aminosäuresequenz, wobei

die DNA der letzteren Aminosäuresequenz mit der DNA von Fig. 1A hybridisiert.

Der Ausdruck "eine durch eine oder mehrere Aminosäuren unterschiedliche Aminosäuresequenz" umfaßt jegliche für ein DEDD kodierende Aminosäuresequenz, deren DNA-Sequenz mit der DNA von Fig. 1A hybridisiert. Die Sequenz kann sich von der DNA von Fig. 1A durch Additionen, Deletionen, Substitutionen und/oder Inversionen von ein oder mehreren Basenpaaren unterscheiden. Insbesondere kann die DNA-Sequenz jene von Fig. 1B sein. Ferner kann die DNA-Sequenz eine solche sein, die für N-DEDD bzw. C-DEDD kodiert (vgl. Beispiel 2 und Fig. 4A). Der Ausdruck "Hybridisierung" weist auf eine Hybridisierung unter üblichen Bedingungen, insbesondere bei 20°C unter dem Schmelzpunkt der Sequenz hin.

Ein weiterer Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist eine Nukleinsäure, die für DEDD kodiert. Die Nukleinsäure kann eine RNA oder eine DNA, z.B. eine cDNA, sein. Bevorzugt ist eine DNA, die folgendes umfaßt:

- (a) Die DNA von Fig. 1A oder eine hiervon durch ein oder mehrere Basenpaare unterschiedliche DNA, wobei letztere DNA mit der DNA von Fig. 1A hybridisiert, oder
- (b) eine mit der DNA von (a) über den degenerierten genetischen Code verwandte DNA.

Der Ausdruck "eine durch ein oder mehrere Basenpaare unterschiedliche DNA" umfaßt jegliche für DEDD kodierende DNA-Sequenz, die mit der DNA von Fig. 1A hybridisiert. Die DNA-Sequenz kann sich von der DNA von Fig. 1A durch Additionen, Deletionen, Substitutionen und/oder Inversionen von ein oder mehreren Basenpaaren unterscheiden. Insbesondere kann die DNA-Sequenz jene von Fig. 1B sein. Die DNAs von Fig. 1A und B wurden als Plasmid bei der DSMZ (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellen) unter DSM 12174 am 14. Mai 1998 hinterlegt. Ferner kann die DNA-Sequenz eine solche sein, die

für N-DEDD bzw. C-DEDD kodiert (vgl. Beispiel 2 und Fig. 4A) Hinsichtlich des Ausdrucks "Hybridisierung" wird auf vorstehende Ausführungen entsprechend verwiesen.

Eine erfindungsgemäße DNA kann als solche oder in Kombination mit jeglicher anderen DNA vorliegen. Insbesondere kann eine erfindungsgemäße DNA in einem Expressionsvektor vorliegen. Beispiele solcher sind dem Fachmann bekannt. Im Falle eines Expressionsvektors für *E. coli* sind dies z.B. pGEMEX, pUC-Derivate, pGEX-2T, pET3b und pQE-8. Für die Expression in Hefe sind z.B. pY100 und Ycpad1 zu nennen, während für die Expression in tierischen Zellen z.B. pKCR, pEFBOS, cDM8 und pCEV4 anzugeben sind. Für die Expression in Insektenzellen eignet sich besonders der Baculovirus-Expressionsvektor pAcSGHisNT-A.

Der Fachmann kennt geeignete Zellen, um die erfindungsgemäße, in einem Expressionsvektor vorliegende DNA zu exprimieren. Beispiele solcher Zellen umfassen die *E. coli*-Stämme HB101, DH1, x1776, JM101, JM 109, BL21 und SG 13009, den Hefe-Stamm *Saccharomyces cerevisiae* und die tierischen Zellen L, NIH 3T3, FM3A, CHO, COS, Vero und HeLa sowie die Insektenzellen sf9.

Der Fachmann weiß, in welcher Weise die erfindungsgemäße DNA in einen Expressionsvektor inseriert werden muß. Ihm ist auch bekannt, daß diese DNA in Verbindung mit einer für ein anderes Protein bzw. Peptid kodierenden DNA inseriert werden kann, so daß die erfindungsgemäße DNA in Form eines Fusionsproteins exprimiert werden kann.

Des weiteren kennt der Fachmann Bedingungen, transformierte bzw. transfizierte Zellen zu kultivieren. Auch sind ihm Verfahren bekannt, das durch die erfindungsgemäße DNA exprimierte Protein bzw. Fusionsprotein zu isolieren und zu reinigen.

Ein weiterer Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist ein gegen ein vorstehendes Protein bzw. Fusionsprotein gerichteter

Antikörper. Ein solcher Antikörper kann durch übliche Verfahren hergestellt werden. Er kann polyklonal bzw. monoklonal sein. Zu seiner Herstellung ist es günstig, Tiere, insbesondere Kaninchen oder Hühner für einen polyklonalen und Mäuse für einen monoklonalen Antikörper, mit einem vorstehenden (Fusions)protein oder Fragmenten davon zu immunisieren. Weitere "Booster" der Tiere können mit dem gleichen (Fusions)protein oder Fragmenten davon erfolgen. Der polyklonale Antikörper kann dann aus dem Serum bzw. Eigelb der Tiere erhalten werden. Für den monoklonalen Antikörper werden Milzzellen der Tiere mit Myelomzellen fusioniert.

Ein weiterer Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist ein Kit. Ein solcher umfaßt eine oder mehrere der folgenden Komponenten:

- (a) eine erfindungsgemäße DNA,
- (b) ein erfindungsgemäßes Protein (DEDD),
- (c) einen erfindungsgemäßen Antikörper, sowie
- (d) übliche Hilfsstoffe, wie Träger, Puffer, Lösungsmittel, Kontrollen, etc.

Von den einzelnen Komponenten können jeweils ein oder mehrere Vertreter vorliegen. Hinsichtlich der einzelnen Ausdrücke wird auf vorstehende Ausführungen verwiesen. Diese gelten hier entsprechend.

Die vorliegende Erfindung ermöglicht es, Apoptose, insbesondere ihre Regulation, zu untersuchen. Mit einem erfindungsgemäßen Antikörper kann DEDD nachgewiesen werden. Es kann eine Beziehung, insbesondere in zeitlicher und quantitativer Hinsicht, von DEDD zu Apoptose, besonders zu ihrer Regulation, hergestellt werden. Ferner kann mit DEDD ein gegen dieses Protein gerichteter Autoantikörper nachgewiesen werden. Beide Nachweise können durch übliche Verfahren, insbesondere einen Western Blot, einen ELISA, eine Immunpräzipitation oder durch Immunfluoreszenz, erfolgen. Desweiteren kann mit einer erfindungsgemäßen Nukleinsäure,

insbesondere einer DNA und hiervon abgeleiteten Primern, die Organisation und die Expression des für DEDD kodierenden Gens nachgewiesen werden. Dieser Nachweis kann in üblicher Weise, insbesondere in einem Southern Blot, oder über "in situ" Hybridisierung, erfolgen.

Darüberhinaus eignet sich die vorliegende Erfindung, Maßnahmen für und gegen das Vorliegen von DEDD in Tieren, besonders Säugetieren und ganz besonders dem Menschen, zu ergreifen. Mit einem erfindungsgemäßen Antikörper kann DEDD inhibiert werden. Andererseits kann auch mit einer erfindungsgemäßen Nukleinsäure, kodierend für DEDD, insbesondere einer DNA, erreicht werden, die unter die Kontrolle eines konstitutiven oder in bestimmten Geweben, induzierbaren Promotors gestellt wird und nach ihrer Expression zur Bereitstellung von DEDD im Körper oder in den bestimmten Geweben führt.

Somit stellt die vorliegende Erfindung Mittel dar, die Regulation von Apoptose nicht nur zu untersuchen, sondern auch gezielt in sie einzugreifen. Dies kann eine besondere Bedeutung bei vielen Erkrankungen haben. Solche sind z.B. Erkrankungen des Immunsystems, wie AIDS, der Leber und Tumorerkrankungen.

Kurze Beschreibung der Zeichnungen.

Fig. 1 zeigt die DNA- und Aminosäuresequenz eines erfindungsgemäßen Proteins (DEDD) aus Mensch (Fig. 1A) und Maus (Fig. 1B) sowie deren Unterschiede (Fig. 1C).

Fig. 2 zeigt die strukturelle Organisation von DEDD, wobei DED "Death Effector Domain", NLS "Nuclear Localization Signal" und P-rich Prolin-reiche Region bedeuten. Die isoelektrischen Punkte für die einzelnen Domänen sind angegeben.

Fig. 3 zeigt den Nachweis von DEDD mRNA in Geweben (Fig.

3A) bzw. Tumorzellen (Fig. 3B).

Fig. 4 zeigt die Induktion von Apoptose durch DEDD. In Fig. 4A werden Deletionsmutanten von DEDD, N-DEDD bzw. C-DEDD, und in Fig. 4B die durch DEDD bzw. diese Deletionsmutanten induzierte Apoptose gezeigt.

Fig. 5 zeigt DEDD als ein DNA-Bindungsprotein, das in Nukleoli die Transkription von ribosomaler DNA inhibiert. In Fig. 5A wird die Bindung von GST-DEDD an λ -DNA gezeigt. In Fig. 5B wird die Bindung von GST-DEDD an DNA gezeigt, die zu einem Nukleosom assembliert ist. In Fig. 5C wird gezeigt, daß die Transkription eines rDNA-Minigens, das hierfür den RNA Polymerase I-Terminationsfaktor (TTF-I) benötigt, durch GST-DEDD inhibiert wird.

Die vorliegende Erfindung wird durch die nachstehenden Beispiele erläutert.

Beispiel 1: Nachweis von DEDD mRNA in Geweben bzw. Zellen

Aus Geweben, wie Herz, Gehirn, Plazenta, Lunge, Leber, Skelett-Muskel, Niere, Pancreas, Milz, Lymphknoten, Thymus, Knochenmark und fötaler Leber, wird PolyA RNA einer Northern Blot-Hybridisierung unterzogen. Hierzu wird eine die PolyA RNA enthaltende Membran (MTN™ Clontech) verwendet und mit einer ³²P markierten DNA-Probe von DEDD, die für DED, das erste NLS und Teile der Prolin-reichen Region kodiert, hybridisiert. Die Hybridisierung erfolgt unter den von Clontech angegebenen Bedingungen (vgl. Fig. 3A).

Ferner wird Gesamt-RNA aus verschiedenen lymphoiden und nicht-lymphoiden Tumorzellen isoliert und einer RT-PCR unterzogen, wobei der RT-PCR Kit von Perkin Elmer unter den angegebenen Bedingungen verwendet wird. Die RT-PCR Proben werden in einer kompetitiven PCR (1 min 95°C, 1 min 59°C, 1 min 72°C, 35 Zyklen) verwendet, wobei die Primer 3 (5'-CGCGGATCCGGGAG-

CATGGCGGGCCTAAAGCGGCG-3') und 4 (5'-CCGGAATTCCGGCTTGTTCTG-GATCACTGAAGGC-3') sowie β -Actin-Primer eingesetzt werden (vgl. Fig. 3B).

Es zeigt sich, daß DEDD ubiquitär exprimiert wird.

Beispiel 2: Induktion von Apoptose durch DEDD bzw. Deletionsmutanten davon

Es werden zwei DEDD-Deletionsmutanten hergestellt. Die eine (nachstehend mit N-DEDD bezeichnet) umfaßt die Aminosäuren 1-114 von DEDD von Fig. 1A, d.h. sie umfaßt DED und NLS1. Die andere (nachstehend mit C-DEDD bezeichnet) umfaßt die Aminosäuren 109 - 318 von DEDD von Fig. 1A, d.h. sie umfaßt die Prolin-reiche Region, NLS2 und die C-terminale Hälfte von DEDD. Ferner weisen die DEDD-Deletionsmutanten jeweils ein FLAG-Peptid auf, nämlich N-DEDD am C-Terminus und C-DEDD am N-Terminus (vgl. Fig. 4A).

293 Zellen werden mit DNAs transient transfiziert, die für DEDD, N-DEDD bzw. C-DEDD kodieren. Ferner werden als Kontrolle DNAs verwendet, die für FADD bzw. Caspase-8 kodieren. Die Transfektion wird mittels des Calciumphosphat-Präzipitations-Verfahrens durchgeführt. 36 Stunden nach Transfektion werden die Zellen geerntet und die DNA-Fragmentation wird als Indiz für Apoptose bestimmt.

Es zeigt sich, daß DEDD, N-DEDD bzw. C-DEDD Apoptose induzieren können, wobei die Induktions-Wirkung von N-DEDD am stärksten ist. Durch Coexpression des Serpin Caspase-Inhibitors crmA kann die Apoptose-Induktion inhibiert werden.

Beispiel 3: DNA-Bindung durch DEDD und Inhibierung der Transkription von ribosomaler (r)DNA

DEDD wird in Form eines Glutathion-S-Transferase (GST)-DEDD-

Fusionsproteins hergestellt. GST-DEDD wird mit λ -DNA bei 0,5 - 2 M NaCl in einen Bindungstest eingesetzt und anschließend einer Agarose-Gelelektrophorese unterzogen. Gleiches wird mit GST alleine bzw. GST-FADD durchgeführt (vgl. Fig. 5A).

Es zeigt sich, daß DEDD einen Komplex mit einer DNA ausbilden kann (vgl. Fig. 5A, Spur 5). Dieser Komplex ist salzbeständig (vgl. Fig. 5A, Spur 7).

Ferner wird GST-DEDD in einen Bindungstest mit einem 248 bp Fragment des Maus-rDNA Promotors eingesetzt, das zu einem Nukleosom assembliert ist. Die molaren Verhältnisse von GST-DEDD zur DNA sind 0-27. Nach dem Bindungstest wird der Reaktionsansatz einer 4,5 % Polyacrylamid-Gelelektrophorese unterzogen (vgl. Fig. 5B).

Es zeigt sich, daß DEDD einen Komplex mit Nukleosomen ausbilden kann.

Desweiteren werden GST-DEDD bzw. GST-FADD in einen in vitro Transkriptionstest eingesetzt. In diesem wird ein Maus-rDNA Minigen in Gegenwart bzw. Abwesenheit des RNA Polymerase I-Terminationsfaktors (TTF-I) transkribiert. Erhaltene, ^{32}P -markierte Transkripte werden einer 4,5 % Polyacrylamid-Gelelektrophorese unterzogen (vgl. Fig. 5C).

Es zeigt sich, daß DEDD die Transkription von rDNA inhibieren kann. Dies weist darauf hin, daß DEDD die Protein-Biosynthese und somit die Synthese von Genprodukten anti-apoptotischer Gene inhibieren kann.

**Beispiel 4: Herstellung und Reinigung eines
erfindungsgemäßen Proteins
(DEDD)**

Die DNA von Fig. 1A wird mit BamHI-Linkern versehen, mit BamHI nachgespalten und in den mit BamHI gespaltenen

Expressionsvektors pQE-8 (Qiagen) inseriert. Es wird das Expressionsplasmid pQE-8/DEDD erhalten. Ein solches kodiert für ein Fusionsprotein aus 6 Histidin-Resten (N-Terminuspartner) und dem erfindungsgemäßen DEDD von Fig. 1A (C-Terminuspartner). pQE-8/DEDD wird zur Transformation von E.coli SG 13009 (vgl. Gottesman, S. et al., J. Bacteriol. 148, (1981), 265-273) verwendet. Die Bakterien werden in einem LB-Medium mit 100 µg/ml Ampicillin und 25 µg/ml Kanamycin kultiviert und 4 h mit 60 µM Isopropyl-β-D-Thiogalactopyranosid (IPTG) induziert. Durch Zugabe von 6 M Guanidinhydrochlorid wird eine Lyse der Bakterien erreicht, anschließend wird mit dem Lysat eine Chromatographie (Ni-NTA-Resin) in Gegenwart von 8 M Harnstoff entsprechend der Angaben des Herstellers (Qiagen) des Chromatographie-Materials durchgeführt. Das gebundene Fusionsprotein wird in einem Puffer mit pH 3,5 eluiert. Nach seiner Neutralisierung wird das Fusionsprotein einer 18 % SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese unterworfen und mit Coomassie-Blau angefärbt (vgl. Thomas, J.O. und Kornberg, R.D., J.Mol.Biol. 149 (1975), 709-733).

Es zeigt sich, daß ein erfindungsgemäßes (Fusions)protein in hochreiner Form hergestellt werden kann.

Beispiel 5: Herstellung und Nachweis eines erfindungsgemäßen Antikörpers

Ein erfindungsgemäßes Fusionsprotein von Beispiel 4 wird einer 18 % SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese unterzogen. Nach Anfärbung des Gels mit 4 M Natriumacetat wird eine ca. 34 kD Bande aus dem Gel herausgeschnitten und in Phosphat gepufferter Kochsalzlösung inkubiert. Gel-Stücke werden sedimentiert, bevor die Proteinkonzentration des Überstandes durch eine SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese, der eine Coomassie-Blau-Färbung folgt, bestimmt wird. Mit dem Gel-gereinigten Fusionsprotein werden Tiere wie folgt immunisiert:

Immunisierungsprotokoll für polyklonale Antikörper im Kaninchen

Pro Immunisierung werden 35 µg Gel-gereinigtes Fusionsprotein in 0,7 ml PBS und 0,7 ml komplettem bzw. inkomplettem Freund's Adjuvans eingesetzt.

- Tag 0: 1. Immunisierung (komplettes Freund's Adjuvans)
Tag 14: 2. Immunisierung (inkomplettes Freund's Adjuvans; icFA)
Tag 28: 3. Immunisierung (icFA)
Tag 56: 4. Immunisierung (icFA)
Tag 80: Ausbluten

Das Serum des Kaninchens wird im Immunoblot getestet. Hierzu wird ein erfindungsgemäßes Fusionsprotein von Beispiel 1 einer SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese unterzogen und auf ein Nitrocellulosefilter übertragen (vgl. Khyse-Andersen, J., J. Biochem. Biophys. Meth. 10, (1984), 203-209). Die Western Blot-Analyse wurde wie in Bock, C.-T. et al., Virus Genes 8, (1994), 215-229, beschrieben, durchgeführt. Hierzu wird das Nitrocellulosefilter eine Stunde bei 37°C mit einem ersten Antikörper inkubiert. Dieser Antikörper ist das Serum des Kaninchens (1:10000 in PBS). Nach mehreren Waschschritten mit PBS wird das Nitrocellulosefilter mit einem zweiten Antikörper inkubiert. Dieser Antikörper ist ein mit alkalischer Phosphatase gekoppelter monoklonaler Ziege Anti-Kaninchen-IgG-Antikörper (Dianova) (1:5000) in PBS. Nach 30-minütiger Inkubation bei 37°C folgen mehrere Waschschrritte mit PBS und anschließend die alkalische Phosphatase-Nachweisreaktion mit Entwicklerlösung (36µM 5' Bromo-4-chloro-3-indolylphosphat, 400µM Nitroblau-tetrazolium, 100mM Tris-HCl, pH 9.5, 100 mM NaCl, 5 mM MgCl₂) bei Raumtemperatur, bis Banden sichtbar werden.

Es zeigt sich, daß erfindungsgemäße, polyklonale Antikörper hergestellt werden können.

Immunisierungsprotokoll für polyklonale Antikörper im Huhn

Pro Immunisierung werden 40µg Gel-gereinigtes Fusionsprotein in 0,8 ml PBS und 0,8 ml komplettem bzw. inkomplettem Freund's Adjuvans eingesetzt.

- Tag 0. 1. Immunisierung (komplettes Freund's Adjuvans)
Tag 28: 2. Immunisierung (inkomplettes Freund's Adjuvans;
 icFA)
Tag 50: 3. Immunisierung (icFA)

Aus Eigelb werden Antikörper extrahiert und im Western Blot getestet. Es werden erfindungsgemäße, polyklonale Antikörper nachgewiesen.

Immunisierungsprotokoll für monoklonale Antikörper der Maus

Pro Immunisierung werden 12µg Gel-gereinigtes Fusionsprotein in 0,25 ml PBS und 0,25 ml komplettem bzw. inkomplettem Freund's Adjuvans eingesetzt; bei der 4. Immunisierung ist das Fusionsprotein in 0,5 ml (ohne Adjuvans) gelöst.

- Tag 0. 1. Immunisierung (komplettes Freund's Adjuvans)
Tag 28: 2. Immunisierung (inkomplettes Freund's Adjuvans;
 icFA)
Tag 56: 3. Immunisierung (icFA)
Tag 84: 4. Immunisierung (PBS)
Tag 87: Fusion


Überstände von Hybridomen werden im Western Blot getestet. Erfindungsgemäße, monoklonale Antikörper werden nachgewiesen.

BUDAPESTER VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE
ANERKENNUNG DER HINTERLEGUNG VON MIKROORGANISMEN
FÜR DIE ZWECKE VON PATENTVERFAHREN

INTERNATIONALES FORMBLATT

Deutsches
Krebsforschungszentrum
Schwerpunkt Tumorummunologie
Abt. Immunogenetik
Im Neuenheimer Feld 280
69120 Heidelberg

LEBENSFÄHIGKEITSBESCHEINIGUNG
ausgestellt gemäß Regel 10.2 von der unten angegebenen
INTERNATIONALEN HINTERLEGUNGSSTELLE

I. HINTERLEGER	II. KENNZEICHNUNG DES MIKROORGANISMUS
Name: Deutsches Krebsforschungszentrum Anschrift: Schwerpunkt Tumorummunologie Abt. Immunogenetik Im Neuenheimer Feld 280 69120 Heidelberg	Von der INTERNATIONALEN HINTERLEGUNGSSTELLE zugeteilte EINGANGSNUMMER: DSM 12174 Datum der Hinterlegung oder Weiterleitung: 1998-05-14
III. LEBENSFÄHIGKEITSBESCHEINIGUNG	
Die Lebensfähigkeit des unter II genannten Mikroorganismus ist am 1998-05-14 geprüft worden. Zu diesem Zeitpunkt war der Mikroorganismus <input checked="" type="checkbox"/> lebensfähig <input type="checkbox"/> nicht mehr lebensfähig	
IV. BEDINGUNGEN, UNTER DENEN DIE LEBENSFÄHIGKEITSPRÜFUNG DURCHGEFÜHRT WORDEN IST*	
V. INTERNATIONALE HINTERLEGUNGSSTELLE	
Name: DSMZ-DEUTSCHE SAMMLUNG VON MIKROORGANISMEN UND ZELLKULTUREN GmbH Anschrift: Mascheroder Weg 1b D-38124 Braunschweig	Unterschrift(en) der zur Vertretung der internationalen Hinterlegungsstelle befugten Person(en) oder des (der) von ihr ermächtigten Bediensteten:  Datum: 1998-05-18

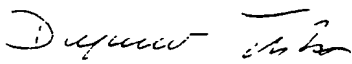
Angabe des Datums der Ersthinterlegung. Wenn eine erneute Hinterlegung oder eine Weiterleitung vorgenommen worden ist, Angabe des Datums der jeweils letzten erneuten Hinterlegung oder Weiterleitung.
 In den in Regel 10.2 Buchstabe a Ziffer ii und iii vorgesehenen Fällen Angabe der letzten Lebensfähigkeitsprüfung.
 Zutreffendes ankreuzen.
 Ausfüllen, wenn die Angaben beantragt worden sind und wenn die Ergebnisse der Prüfung negativ waren.

BUDAPESTER VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE
ANERKENNUNG DER HINTERLEGUNG VON MIKROORGANISMEN
FÜR DIE ZWECKE VON PATENTVERFAHREN

INTERNATIONALES FORMBLATT

Deutsches
Krebsforschungszentrum
Schwerpunkt Tumorummunologie
Abt. Immunogenetik
Im Neuenheimer Feld 280
69120 Heidelberg

EMPFANGSBESTÄTIGUNG BEI ERSTHINTERLEGUNG.
ausgestellt gemäß Regel 7.1 von der unten angegebenen
INTERNATIONALEN HINTERLEGUNGSSTELLE

I. KENNZEICHNUNG DES MIKROORGANISMUS	
Vom HINTERLEGER zugeteiltes Bezugszeichen: DEDD	Von der INTERNATIONALEN HINTERLEGUNGSSTELLE zugeteilte EINGANGSNUMMER: DSM 12174
II. WISSENSCHAFTLICHE BESCHREIBUNG UND/ODER VORGESCHLAGENE TAXONOMISCHE BEZEICHNUNG	
Mit dem unter I. bezeichneten Mikroorganismus wurde <input checked="" type="checkbox"/> (X) eine wissenschaftliche Beschreibung <input type="checkbox"/> () eine vorgeschlagene taxonomische Bezeichnung eingereicht. (Zutreffendes ankreuzen).	
III. EINGANG UND ANNAHME	
Diese internationale Hinterlegungsstelle nimmt den unter I bezeichneten Mikroorganismus an, der bei ihr am 1998-05-14 (Datum der Ersthinterlegung) eingegangen ist.	
IV. EINGANG DES ANTRAGS AUF UMWANDLUNG	
Der unter I bezeichnete Mikroorganismus ist bei dieser internationalen Hinterlegungsstelle am eingegangen (Datum der Ersthinterlegung) und ein Antrag auf Umwandlung dieser Ersthinterlegung in eine Hinterlegung gemäß Budapest Vertrag ist am eingegangen (Datum des Eingangs des Antrags auf Umwandlung).	
V. INTERNATIONALE HINTERLEGUNGSSTELLE	
Name: DSMZ-DEUTSCHE SAMMLUNG VON MIKROORGANISMEN UND ZELLKULTUREN GmbH Anschrift: Mascheroder Weg 1b D-38124 Braunschweig	Unterschrift(en) der zur Vertretung der internationalen Hinterlegungsstelle befugten Person(en) oder des (der) von ihr ermächtigten Bediensteten:  Datum: 1998-05-18

¹ Falls Regel 6.4 Buchstabe d zutrifft, ist dies der Zeitpunkt, zu dem der Status einer internationalen Hinterlegungsstelle erworben worden ist.

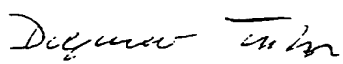
BUDAPEST TREATY ON THE INTERNATIONAL
RECOGNITION OF THE DEPOSIT OF MICROORGANISMS
FOR THE PURPOSES OF PATENT PROCEDURE

INTERNATIONAL FORM

Deutsches
Krebsforschungszentrum
Schwerpunkt Tumorummunologie
Abt. Immunogenetik
Im Neuenheimer Feld 280

69120 Heidelberg

VIABILITY STATEMENT
issued pursuant to Rule 10.2 by the
INTERNATIONAL DEPOSITARY AUTHORITY
identified at the bottom of this page

I. DEPOSITOR		II. IDENTIFICATION OF THE MICROORGANISM	
Name: Deutsches Krebsforschungszentrum Address: Schwerpunkt Tumorummunologie Abt. Immunogenetik Im Neuenheimer Feld 280 69120 Heidelberg		Accession number given by the INTERNATIONAL DEPOSITARY AUTHORITY: DSM 12174 Date of the deposit or the transfer: 1998-05-14	
III. VIABILITY STATEMENT			
The viability of the microorganism identified under II above was tested on 1998-05-14. On that date, the said microorganism was <input checked="" type="checkbox"/> (X) viable <input type="checkbox"/> () no longer viable			
IV. CONDITIONS UNDER WHICH THE VIABILITY TEST HAS BEEN PERFORMED			
V. INTERNATIONAL DEPOSITARY AUTHORITY			
Name: DSMZ-DEUTSCHE SAMMLUNG VON MIKROORGANISMEN UND ZELLKULTUREN GmbH Address: Mascheroder Weg 1b D-38124 Braunschweig		Signature(s) of person(s) having the power to represent the International Depositary Authority or of authorized official(s):  Date: 1998-05-18	

- 1 Indicate the date of original deposit or, where a new deposit or a transfer has been made, the most recent relevant date (date of the new deposit or date of the transfer).
- 2 In the cases referred to in Rule 10.2(a) (ii) and (iii), refer to the most recent viability test.
- 3 Mark with a cross the applicable box.
- 4 Fill in if the information has been requested and if the results of the test were negative.

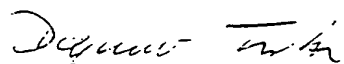
BUDAPEST TREATY ON THE INTERNATIONAL
RECOGNITION OF THE DEPOSIT OF MICROORGANISMS
FOR THE PURPOSES OF PATENT PROCEDURE

INTERNATIONAL FORM

Deutsches
Krebsforschungszentrum
Schwerpunkt Tumorummunologie
Abt. Immunogenetik
Im Neuenheimer Feld 280

69120 Heidelberg

RECEIPT IN THE CASE OF AN ORIGINAL DEPOSIT
issued pursuant to Rule 7.1 by the
INTERNATIONAL DEPOSITARY AUTHORITY
identified at the bottom of this page

I. IDENTIFICATION OF THE MICROORGANISM	
Identification reference given by the DEPOSITOR: DEDD	Accession number given by the INTERNATIONAL DEPOSITARY AUTHORITY: DSM 12174
II. SCIENTIFIC DESCRIPTION AND/OR PROPOSED TAXONOMIC DESIGNATION	
The microorganism identified under I. above was accompanied by: (X) a scientific description () a proposed taxonomic designation (Mark with a cross where applicable).	
III. RECEIPT AND ACCEPTANCE	
This International Depositary Authority accepts the microorganism identified under I. above, which was received by it on 1998-05-14 (Date of the original deposit) ¹ .	
IV. RECEIPT OF REQUEST FOR CONVERSION	
The microorganism identified under I above was received by this International Depositary Authority on (date of original deposit) and a request to convert the original deposit to a deposit under the Budapest Treaty was received by it on (date of receipt of request for conversion).	
V. INTERNATIONAL DEPOSITARY AUTHORITY	
Name: DSMZ-DEUTSCHE SAMMLUNG VON MIKROORGANISMEN UND ZELLKULTUREN GmbH Address: Mascheroder Weg 1b D-38124 Braunschweig	Signature(s) of person(s) having the power to represent the International Depositary Authority or of authorized official(s):  Date: 1998-05-18

¹ Where Rule 6.4 (d) applies, such date is the date on which the status of international depositary authority was acquired.

Patentansprüche

1. Protein, geeignet zur Regulation von Apoptose, umfassend die Aminosäuresequenz von Fig. 1A oder eine hiervon durch eine oder mehrere Aminosäuren unterschiedliche Aminosäuresequenz, wobei die DNA-Sequenz der letzteren Aminosäuresequenz mit der DNA von Fig. 1A hybridisiert.
5
2. Protein nach Anspruch 1, umfassend die Aminosäuren 1 - 114 von Fig. 1A.
- 10 3. Protein nach Anspruch 1, umfassend die Aminosäuren 109 - 318 von Fig. 1A.
4. DNA, kodierend für das Protein nach Anspruch 1, umfassend:
15 (a) Die DNA von Fig. 1A oder eine hiervon durch ein oder mehrere Basenpaare unterschiedliche DNA, wobei letztere DNA mit der DNA von Fig. 1A hybridisiert, oder
(b) eine mit der DNA von (a) über den degenerierten genetischen Code verwandte DNA.
20
5. DNA nach Anspruch 4, wobei die DNA die Basenpaare 28 - 369 von Fig. 1A umfaßt.
- 25 6. DNA nach Anspruch 4, wobei die DNA die Basenpaare 352 - 981 von Fig. 1A umfaßt.
7. DNA nach Anspruch 4, wobei die DNA jene von Fig. 1B ist.
- 30 8. Expressionsplasmid, umfassend die DNA nach einem der Ansprüche 4-7.
9. Transformante, enthaltend das Expressionsplasmid nach Anspruch 8.

10. Verfahren zur Herstellung des Proteins nach Anspruch 1, umfassend die Kultivierung der Transformante nach Anspruch 9 unter geeigneten Bedingungen.
- 5 11. Antikörper, gerichtet gegen das Protein nach einem der Ansprüche 1- 3.
12. Verwendung des Proteins nach einem der Ansprüche 1-3 oder einer DNA nach einem der Ansprüche 4-7 zur Regulation von Apoptose bzw. deren diagnostischer Erfassung.
- 10 13. Verwendung nach Anspruch 12, wobei die Regulation von Apoptose bei Erkrankungen erfolgt.
- 15 14. Verwendung nach Anspruch 13, wobei die Erkrankungen solche des Immunsystems, wie AIDS, oder Tumorerkrankungen umfassen.

1/7

AAAGCATTCGCTACCTGAGCCCCCAGCATGCGCGGCTAAAGCGCGGGCAAGCCAGGTGTGGCCAGAGAGAGCATGGTGAGCAGGAACAC 90
Met Ala Gly Leu Lys Arg Arg Ala Ser Gln Val Trp Pro Glu Glu His Gly Glu His 21

GGCTGTACAGCGCTGCACCGCATGTTTGACATCGTGGGCACTCATCTGACACACAGAGATGTGCGCGTCTTTCTTTCCCTCTTTGTTGAT 180
Gly Leu Tyr Ser Leu His Arg Met Phe Asp Ile Val Gly Thr His Leu Thr His Arg Asp Val Arg Val Leu Ser Phe Leu Phe Val Asp 51

GTCAATGATGACCACGAGCGTGGACATCCGAAATGGACGTGACTTCTTATTTGGCACCTGGAGCGCCAGGGCCGCTGTGATGAAGTAAAC 270
Val Ile Asp Asp His Glu Arg Gly Leu Ile Arg Asn Gly Arg Asp Phe Leu Leu Ala Leu Glu Arg Gln Gly Arg Cys Asp Glu Ser Asn 81

TTTCGCCAGGTGCTGCAGCTGCTGGCATCATCACTCGCCAGGACCTGCTGCCCCCTACGTACACCCCTCAAGAGGAGACGGGCTGTGCCCCCT 360
Phe Arg Gln Val Leu Gln Leu Leu Arg Ile Thr Arg His Asp Leu Leu Pro Tyr Val Thr Leu Lys Arg Arg Ala Val Cys Pro 111

GATCTTGTAGACAAGTATCTGGAGGAGACATCAATTGCTATGTGACCCCGAGGCCCTCAGTGATCCAGAACCAAGGCCCTCCCCAGCCC 450
Asp Leu Val Asp Lys Tyr Leu Glu Glu Thr Ser Ile Arg Tyr Val Thr Pro Arg Ala Leu Ser Asp Pro Glu Pro Arg Pro Gln Pro 141

ICTAAACAGGTGCTCCCCACTATCCTGTGTGTGTGTTGCCCCACCTTCGGGTCTCTCAGATGTGTAGCAAGCGGCCAGCCCGAGGGAGAGGCC 540
Ser Lys Thr Val Pro Pro His Tyr Pro Val Val Cys Cys Pro Thr Ser Gly Pro Gln Met Cys Ser Lys Arg Pro Ala Arg Gly Ala 171

ACACTTGGGAGCCAGCGAAACCGCGAAGTCAGTGACACCCAGATCCCAAGGAGAGAGACACATGTGACATCAGACTGCGGGTTTCGGGCT 630
Thr Leu Gly Ser Gln Arg Lys Arg Arg Lys Ser Val Thr Pro Asp Pro Lys Glu Lys Gln Thr Cys Asp Ile Arg Leu Arg Val Arg Ala 201

GAATACTGCCAGCATGAGACTGCTTGCAGGGCAATGTCTTCTTAACAAGCAGGACCCCACTTGAGCGCCAGTTTGAGCGCTTTAACCAG 720
Glu Tyr Cys Gln His Glu Thr Ala Leu Gln Gly Asn Val Phe Ser Asn Lys Gln Asp Pro Leu Glu Arg Gln Phe Glu Arg Phe Asn Gln 231

GCCAACACCATCCTCAAGTCCCGGACCTGGCTCCCATCATCTGTGACATCAAGTTCCTCTGAGGCTCACCTTACCCTCGATGCAATTCCTGGCGT 810
Ala Asn Thr Ile Leu Lys Ser Arg Asp Leu Gly Ser Ile Ile Cys Asp Ile Lys Phe Ser Glu Leu Thr Tyr Leu Asp Ala Phe Trp Arg 261

GACTACATCAATGGCTCTTTATTAGAGGCACCTTAAAGGTGCTTTCATCAGAGACICCCCTCAAGCAAGCTGTGGGCCATGAAGCCATCAAG 900
Asp Tyr Ile Asn Gly Ser Leu Leu Glu Ala Leu Lys Gly Val Phe Ile Thr Asp Ser Leu Lys Gln Ala Val Gly His Glu Ala Ile Lys 291

CTGCTGGTAAATGTAGACGAGGAGGACTATGAGCTGGGCCCGACAGAACTCTCTGAGGAACCTTGATGCTGCAAGCTTTGCCCCCTGACCTATT 990
Leu Leu Val Asn Val Asp Glu Asp Tyr Glu Leu Gly Arg Gln Lys Leu Leu Arg Asn Leu Met Leu Gln Ala Leu Pro 318

CCCTCTTCTCAGTTTGGGGACTGTTCCTCATCCCCACCTCTGGAGCTTACA--CTGTCTGGGGTTTGTCTCTACCCCTTCCAACCAATC 1080

ACACCCCTGGCCTTTTTTTTTTTTTTTTTTAA--GAAAAAGACAAAAGAGTGGAAAGTGGT 1139

Fig. 1A

AAAGCACTGTATTTCTGAGCCCTAGCATGGCGGGCCCTAAAGAGGGCGGCAAGCCAGGTGGCCCGAAGAGCGTGGGGAGCAAGAACAT 90
 Met Ala Gly Leu Lys Arg Arg Ala Ser Gln Val Trp Pro Glu Glu Gly Glu Glu His 21
 GGGCTCTACAGCCTCCACCGCATGTTCCGACATCGTGGGCACCCACCTAACACACAGAGATGTCGAGTGCCTTTCCTTCTTTTGTGAT 180
 Gly Leu Tyr Ser Leu His Arg Met Phe Asp Ile Val Gly Thr His Leu Thr His Arg Asp Val Arg Val Leu Ser Phe Leu Phe Val Asp 51
 GTTATTGATGACCATGAACGGTGGACTCATCCGAAATGGACGTGACTTCTTATTGGCACCTGGAGCCCGCGCTGTGACGAGAGTAAC 270
 Val Ile Asp Asp His Glu Arg Gly Leu Ile Arg Asn Gly Arg Asp Phe Leu Leu Ala Leu Glu Arg Gln Gly Cys Asp Glu Ser Asn 81
 TTTCCGCCAGGTGCTGCACCTGCTGGCGCATCATCCTGCCATGACTTGCTGCCCTACGTTACTCTCAAGAAGAGACGAGCTGTGTGCCCT 360
 Phe Arg Gln Val Leu Gln Leu Leu Arg Ile Ile Thr Arg His Asp Leu Leu Pro Tyr Val Thr Leu Lys Lys Arg Arg Ala Val Cys Pro 111
 GATCTTGTAGACAAGTATCTGGAGGAAACATCAATTCCGCTATGTGACCCCGAGAGCCCTCAGTACCCAGAACCGAGGCTCCCGAGCCC 450
 Asp Leu Val Asp Lys Tyr Leu Glu Glu Thr Ser Ile Arg Tyr Val Thr Pro Arg Ala Leu Ser Asp Pro Glu Pro Arg Pro Gln Pro 141
 TCTAAACAGTGCTCCCGCACTATCTGTGTGTGCTGCTGCCCGACCTTCGGGTCTCAAAATGTGTAGTAAAGCGGCGCCGAGGAGGAGAAC 540
 Ser Lys Thr Val Pro Pro His Tyr Pro Val Val Cys Cys Pro Thr Ser Gly Ser Gln Met Cys Ser Lys Arg Pro Ala Arg Gly Arg Thr 171
 ACATTGGGAGCCAGCGCAAAACCGCGAAGTCTGGTGACACACAGACCCGAAAGGAAAGCAGACATGTGTATATCAGGCTCCGAGTTCGGGCG 630
 Thr Leu Gly Ser Gln Arg Lys Arg Arg Lys Ser Val Thr Pro Asp Pro Lys Lys Glu Thr Cys Asp Ile Arg Leu Arg Val Arg Ala 201
 GAAATAGTCCAGCATGAGACGGCTCTGCCAAGGCAATGTCTTCTTCCAATAAGCAGGACCCACCTTGAGCGCCAGTTTGAGCGCTTTAACCAG 720
 Glu Tyr Cys Gln His Glu Thr Ala Leu Gln Gly Asn Val Phe Ser Asn Lys Gln Asp Pro Leu Glu Arg Gln Phe Arg Phe Asn Gln 231
 GCCAACACTATCTCAAGTCCCGGACCTGGGCTCCATCATCTGTGACATCAAGTCTCTGAGCTCACCTTACCTCGACGCATTCTGGCGA 810
 Ala Asn Thr Ile Leu Lys Ser Arg Asp Leu Gly Ser Ile Ile Cys Asp Ile Lys Phe Ser Glu Leu Thr Tyr Leu Asp Ala Phe Trp Arg 261
 GACTACATTAAATGGCTCATTTATTAGAGGCACCTGAAAGGTGTCTTTCATCATCAGACTCTCTCAAGCAAGCTGTGGGCCCATGAAGCCATCAAG 900
 Asp Tyr Ile Asn Gly Ser Leu Leu Glu Ala Leu Lys Gly Val Phe Ile Thr Asp Ser Leu Lys Gln Ala Val Gly His Glu Ala Ile Lys 291
 CTGCTGGTGAACGTGGATGAGGAGGACTATGAGCTGGGCGGACAGAACTCTCTGAGGAACCTTGATGCTGCAGGCATTACCCCTGACCTTTC 990
 Leu Leu Val Asn Val Asp Glu Glu Asp Tyr Glu Leu Gly Arg Gln Lys Leu Leu Arg Asn Leu Met Leu Gln Ala Leu Pro 318
 CCGTCTCACCTTTCTGGGACGTGTGCGCTCCGCTCACCTCTGGAGCTGACATACTGTCTGGGGTTTGTCTCTACCCCTTTCACCAACCAAT 1080
 CACACCGCCTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTAAAGGAAAGACAAAGGAGGTGGAAGTGGT 1142

Fig. 18

Met Ala Gly Leu Lys Arg Arg Ala Ser Gln Val Trp Pro Glu Glu His Gly Glu Gln Glu His 1

hu AAAGCATTTCTGACCTGAGCCCTTACGATGCGGGGCCATAAGCGGGGGGCAAGCCAGGTGTGGCCGAAGAGGAGATGGTGAACAGGAACAT 90

mu AAAGCATTTCTGACCTGAGCCCTTACGATGCGGGGCCATAAGCGGGGGCAAGCCAGGTGTGGCCGAAGAGGAGATGGTGAACAGGAACAT

Met Ala Gly Leu Lys Arg Arg Ala Ser Gln Val Trp Pro Glu Glu Arg Gly Glu Gln Glu His

hu Gly Leu Tyr Ser Leu His Arg Met Phe Asp Ile Val Gly Thr His Leu Thr His Arg Asn Val Arg Val Leu Ser Phe Leu Phe Val Asn 51

GGGCTGTACAGCCTGCACCGCATGTTTGACATCGTGGGCACTTCTTACACACAGAGAGATGTGGCGGTGCTTTCTTCTCTTTTGTGTGAT 180

mu GGGCTGTACAGCCTGCACCGCATGTTTGACATCGTGGGCACTTCTTACACACAGAGAGATGTGGCGGTGCTTTCTTCTCTTTTGTGTGAT

Gly Leu Tyr Ser Leu His Arg Met Phe Asp Ile Val Gly Thr His Leu Thr His Arg Asp Val Arg Val Leu Ser Phe Leu Phe Val Asn

hu Val Ile Asp Asp His Glu Arg Gly Leu Ile Arg Asn Gly Arg Asn Phe Leu Leu Ala Leu Glu Gln Gly Arg Cys Asp Glu Ser Asn 8

GTTATTGATGACCAAGGAGCTGGGACTCATCGAAATGGACGTGACTTCTTATTGGCACTGGAGCGCCAGGGCCGCTGTGATGAAGTAAC 270

mu GTTATTGATGACCAAGGAGCTGGGACTCATCGAAATGGACGTGACTTCTTATTGGCACTGGAGCGCCAGGGCCGCTGTGATGAAGTAAC

Val Ile Asp Asp His Glu Arg Gly Leu Ile Arg Asn Gly Arg Asn Phe Leu Leu Ala Leu Glu Gln Gly Arg Cys Asp Glu Ser Asn

hu Phe Arg Gln Val Leu Gln Leu Leu Arg Ile Ile Thr Arg His Asp Leu Leu Pro Tyr Val Thr Leu Lys Arg Arg Ala Val Cys Pro 111

TTTCGCCAGGTGCTGCAGCTGCTGCGCATCATCACTCGCCAGGACTGTGCTGCCCTACGTTTAACTTCAAGAGGAGACCGCTGTGTGCCCT 360

mu TTTCGCCAGGTGCTGCAGCTGCTGCGCATCATCACTCGCCAGGACTGTGCTGCCCTACGTTTAACTTCAAGAGGAGACCGCTGTGTGCCCT

Phe Arg Gln Val Leu Gln Leu Leu Arg Ile Ile Thr Arg His Asp Leu Leu Pro Tyr Val Thr Leu Lys Arg Arg Ala Val Cys Pro

hu Asp Leu Val Asp Lys Tyr Leu Glu Glu Thr Ser Ile Arg Tyr Val Thr Pro Arg Ala Leu Ser Asp Pro Glu Pro Arg Pro Gln Pro 141

GATCTTGTAGACAAGTATCTGGAGGAGACATCAATTGCGTATGTGACCCCCAGAGCCCTCAAGTATCCAGAACCAAGGCCCTCCCAAGCC 450

mu GATCTTGTAGACAAGTATCTGGAGGAGACATCAATTGCGTATGTGACCCCCAGAGCCCTCAAGTATCCAGAACCAAGGCCCTCCCAAGCC

Asp Leu Val Asp Lys Tyr Leu Glu Glu Thr Ser Ile Arg Tyr Val Thr Pro Arg Ala Leu Ser Asp Pro Glu Pro Arg Pro Gln Pro

hu Ser Lys Thr Val Pro Pro His Tyr Pro Val Val Cys Cys Pro Thr Ser Gly Pro Gln Met Cys Ser Lys Arg Pro Ala Arg Gly Arg Ala 171

TCTAAACAGTGCCTCCCACTATCTGTGGTGTCTTGGCCCACTTGGGGTACAGATGTGTAGTAAGCGGCCAGCCGAGGGAGAGCC 540

mu TCTAAACAGTGCCTCCCACTATCTGTGGTGTCTTGGCCCACTTGGGGTACAGATGTGTAGTAAGCGGCCAGCCGAGGGAGAGCC

Ser Lys Thr Val Pro Pro His Tyr Pro Val Val Cys Cys Pro Thr Ser Gly Ser Gln Met Cys Ser Lys Arg Pro Ala Arg Gly Arg Thr

hu Thr Leu Gly Ser Gln Arg Lys Arg Lys Ser Val Thr Thr Pro Asp Pro Lys Glu Lys Gln Thr Cys Asp Ile Arg Leu Arg Val Arg Ala 201

ACACTTGGGAGCCAGCGAAACGCCGGAAGTCTGTGACACCAGATCCCAAGGTAAGCAGACATGTGATATCAGGCTCCGAGTTTGGGGT 630

mu ACACTTGGGAGCCAGCGAAACGCCGGAAGTCTGTGACACCAGATCCCAAGGTAAGCAGACATGTGATATCAGGCTCCGAGTTTGGGGT

Thr Leu Gly Ser Gln Arg Lys Arg Lys Ser Val Thr Thr Pro Asp Pro Lys Glu Lys Gln Thr Cys Asp Ile Arg Leu Arg Val Arg Ala

hu Gly Tyr Gln His Gln Thr Ala Leu Gln Gly Asn Val Phe Ser Asn Lys Gln Asp Pro Leu Glu Arg Gln Phe Glu Arg Phe Asn Gln 231

GAATACTGCCAGCATGAGACCTCTGCGAGGGCAATGTCTTCTTAAAGCAGGAGCCCACTTGAGCGCCAGTTTGAGCGCTTAAACCAG 720

mu GAATACTGCCAGCATGAGACCTCTGCGAGGGCAATGTCTTCTTAAAGCAGGAGCCCACTTGAGCGCCAGTTTGAGCGCTTAAACCAG

Gly Tyr Gln His Gln Thr Ala Leu Gln Gly Asn Val Phe Ser Asn Lys Gln Asp Pro Leu Glu Arg Gln Phe Glu Arg Phe Asn Gln

hu Ala Asn Thr Ile Leu Lys Ser Arg Asp Leu Gly Ser Ile Ile Cys Asp Ile Lys Phe Ser Glu Leu Thr Tyr Phe Glu Asp Ala Phe Trp Arg 261

GCCAACACATCTCTCAAGTCCCGGGACCTGGGCTCCATCATCTGTGACATCAAGTCTCTGAGCTCACTTACCTCGAGTGCATTCTGGCT 810

mu GCCAACACATCTCTCAAGTCCCGGGACCTGGGCTCCATCATCTGTGACATCAAGTCTCTGAGCTCACTTACCTCGAGTGCATTCTGGCT

Ala Asn Thr Ile Leu Lys Ser Arg Asp Leu Gly Ser Ile Ile Cys Asp Ile Lys Phe Ser Glu Leu Thr Tyr Leu Asp Ala Phe Trp Arg

hu Asp Tyr Ile Asn Gly Ser Leu Glu Asp Tyr Glu Leu Glu Asp Tyr Glu Lys Gln Ala Val Phe Ile Thr Asp Ser Leu Lys Gln Ala Val Gly His Glu Ala Ile Lys 291

GACTACATTAATGGCTCTTATTAGAGGCACATAAGGTGTCTTATCAGACAGACTCTCTCAAGCAAGCTGTGGGCCATGAAGCCATCAAG 900

mu GACTACATTAATGGCTCTTATTAGAGGCACATAAGGTGTCTTATCAGACAGACTCTCTCAAGCAAGCTGTGGGCCATGAAGCCATCAAG

Asp Tyr Ile Asn Gly Ser Leu Glu Asp Tyr Glu Leu Glu Asp Tyr Glu Lys Gln Ala Val Phe Ile Thr Asp Ser Leu Lys Gln Ala Val Gly His Glu Ala Ile Lys

hu Leu Leu Val Asn Val Asp Glu Glu Asp Tyr Glu Leu Glu Arg Gln Lys Leu Leu Arg Asn Leu Met Leu Gln Ala Leu Pro 318

CTGCTGTGTAATGAGTGAAGGAGGACTATGAGCTGGGCGACAGAAATCTTGAGGAACCTTGATGCTGCAAGCATTCCTGACCTTCTGACCT 990

mu CTGCTGTGTAATGAGTGAAGGAGGACTATGAGCTGGGCGACAGAAATCTTGAGGAACCTTGATGCTGCAAGCATTCCTGACCTTCTGACCT

Leu Leu Val Asn Val Asp Glu Glu Asp Tyr Glu Leu Glu Arg Gln Lys Leu Leu Arg Asn Leu Met Leu Gln Ala Leu Pro

hu CCCTCTTCTTACCTTGGGACTGTTTCTCATGACCACTCTGGAGCTTACATCTGTTCTGGGGTTTGTCTCTACCTTCTCAAGCAAT 1080

mu CCCTCTTCTTACCTTGGGACTGTTTCTCATGACCACTCTGGAGCTTACATCTGTTCTGGGGTTTGTCTCTACCTTCTCAAGCAAT

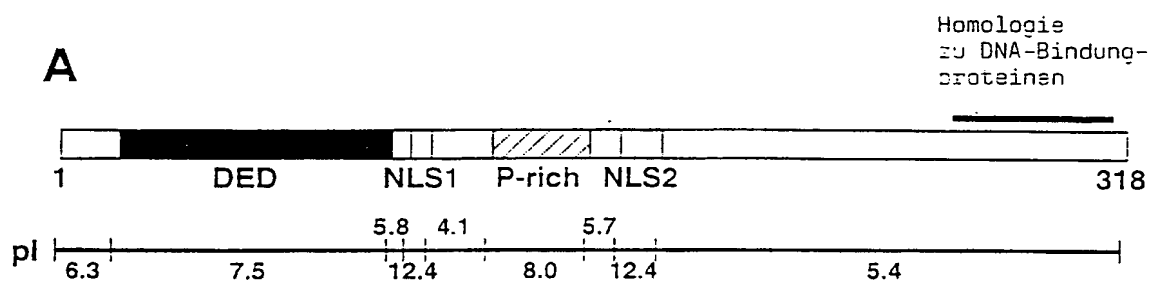
hu ACACCTCTGGCCCTTTTTTTTTTTTTTTTTTAAAGCAAAAGACAAAGAGTGAAGTGGT 1139

mu ACACCTCTGGCTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTAAAGCAAAAGACAAAGAGTGAAGTGGT 1149

Fig. 1C

4/7

Fig. 2



5/7

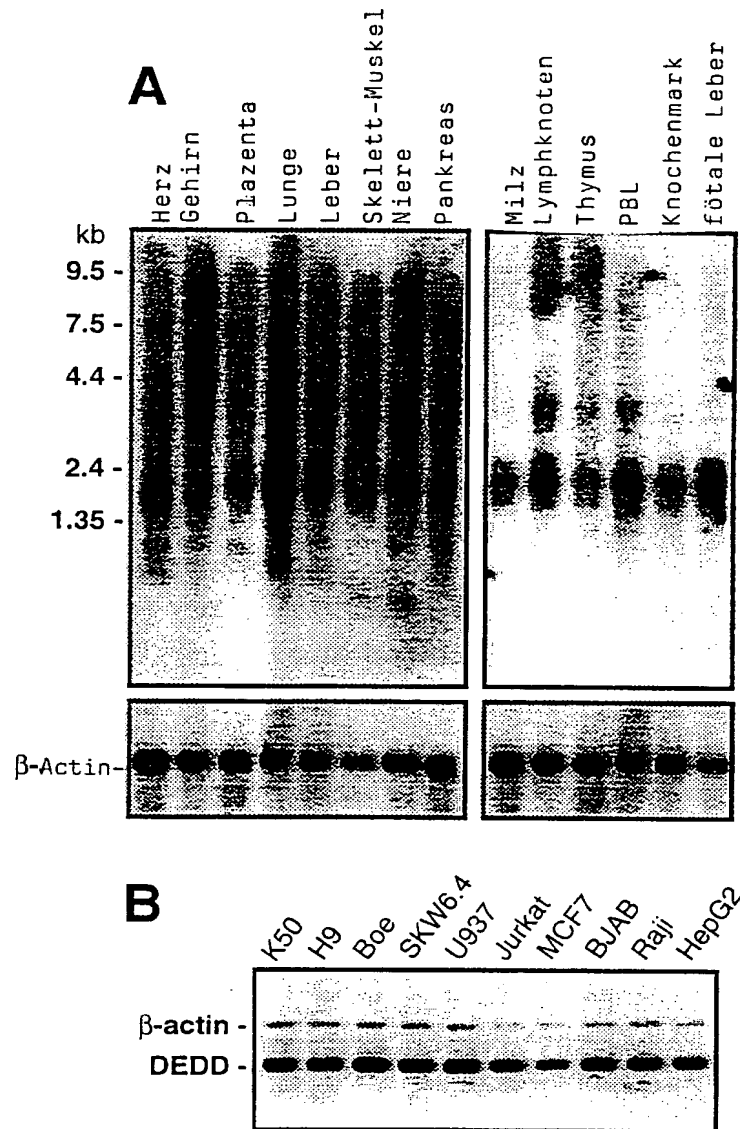


Fig. 3

6/7

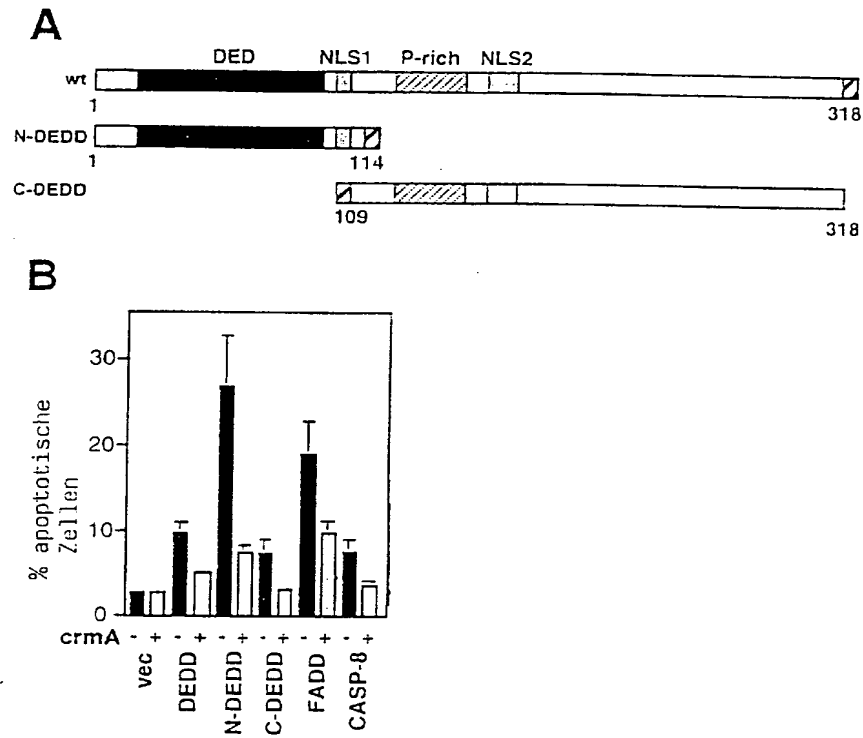


Fig. 4

7/7

